ANREICHERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER 17ß-HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE AUS DEM MYOMETRIUM VON KANINCHEN

Klaus-Jürgen Thun

1967

AUS DER 1. FRAUENKLINIK UND HEBAMMENSCHULE
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. Bickenbach

ANREICHERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER 17ß-HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE AUS DEM MYOMETRIUM VON KANINCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Klaus - Jürgen Thun
aus Coburg

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Bickenbach

Dekan: Prof. Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 3. 10. 1967

UNIV. LEIDEN BIBL.

Druck: H. M. Hessel, 8 München 80, Pariser Str. 44

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Material und Methoden	4
Ergebnisse	9
Bestimmung der Homogenisierdauer	9
Bestimmung der Zentrifugierbeschleunigung	10
Hitzeschritt	10
Fraktionierte 2. Ammonsulfatfällung	11
Sephadex Gelfiltration	11
Anreicherung des Enzyms	13
Abhängigkeit des Substratumsatzes von Puffer und pH-Wert	14
Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Substratkonzentration	16
Substratspezifität des Enzyms	18
Cofaktoren	19
Nachweis von SH-Gruppen	20
Bestimmung der Molekülgröße	21
Diskussion der Versuchsergebnisse	24
Zusammenfassung	31
Literatur	33
Lebenslauf	43

EINLEITUNG

Steroiddehydrogenasen gehören zur Gruppe der Oxydoreduktasen. Sie katalysieren die Umwandlung von Steroidalkoholen in Steroidketone. Die reagierende Hydroxy- bzw. Oxogruppe des Steroidmoleküls wird bei der Kennzeichnung des Enzyms als Präfix vorangestellt, z.B. 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

Steroiddehydrogenasen wurden bisher in einer Vielzahl von Organismen und Organen nachgewiesen. So konnte TALALAY 1952 eine 3ß,17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus einer mit Testosteron beimpften Kultur von Pseudomonas testosteroni (68) nachweisen und ihre Eigenschaften aufzeigen (13,49,50,51,70). Von der 3ß, 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase wurde eine 3α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase abgetrennt (20,34,35,51, 66,70).

Im Jahre 1953 entdeckte SCHNEIDER in der Säugetierleber eine 21-Dehydrogenase, die die Aldehydgruppe an C_{21} von 11ß,17α-Dihydroxy-21-oxopregn, 4-en-3,20-dion zum entsprechenden Alkohol reduzierte (65).

In den folgenden Jahren fand man, daß die Δ4- und Δ5-Steroid-Isomerasen aus Pseudomonas testosteroni (63,71) auch als Dehydrogenasen wirken: die Δ5,3ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3,49,62,63,71,75), die Δ4,3α- und Δ4,3ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (76).

Weiter konnten die 11ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Ratten- und Mäuseleber von DOUNCE u.a.(12,19) identifiziert werden und die 17ß-Östradiol-Dehydrogenase

---

Die Zahlen in Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis Seite

aus menschlicher Plazenta von LANGER und ENGEL (47,48). Dieses Enzym ist wahrscheinlich mit der später von JARABAK, ADAMS, WILLIAMS-ASHMAN und TALALAY beschriebenen 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase identisch (37).

Die von HÜBENER u.a. aus Streptomyces hydrogenans sowie aus der Rattenleber isolierten und kristallisierten 20α- und 20ß-Steroid-Dehydrogenasen (15,16,24,32,56, 57,64,73,74) haben für die Bestimmung der 20-Ketosteroide und die Progesteronbestimmung nach ZANDER und HENNING praktische Bedeutung erlangt (5).

Die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, die TALALAY et al.(37) aus menschlicher Plazenta etwa 2500 fach anreichern konnte, erlangte besonderes Interesse. Das Enzym soll nach Ansicht TALALAY's eine Schlüsselfunktion beim Wirkungsmechanismus der Östrogene haben. Jedoch ist diese Hypothese nicht unwidersprochen geblieben (46,80,81).

17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen wurden in den letzten Jahren in einer Reihe von Warm- und Kaltblüterorganen mit biochemischen und histochemischen Methoden nachgewiesen. So isolierte BREUER eine 17ß-Östradiol: NAD - Oxydoreduktase aus dem Lebercytoplasma von Fischen und Amphibien (9,10). Im Säugetierorganismus gelang der Nachweis in den Erfolgsorganen der männlichen und weiblichen Sexualhormone wie in Prostata und Samenblasen von Ratten und Meerschweinchen durch KINSON und KOCHAKIAN (42), in menschlichem Endometrium durch VILLEE et al.(29) und im experimentellen Mammatumor durch BREUER et al., HOLLANDER et al.(11,30).

Ferner wurde gezeigt, daß die Hypophyse (77), Leber (20,45), Niere (8,44) und Nebenniere (14) von Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen eine 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase enthalten. In den Erythrozyten war

ebenfalls eine 17ß-Östradiol-Dehydrogenase beim Menschen und bei 14 Tierarten nachweisbar (7,60).

Im Myometrium konnte JÜTTING eine Östradiol - spezifische 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase nachweisen. Die Aktivität des Enzyms war dabei abhängig vom Funktionszustand des Organs. So zeigte sich im Laufe der Schwangerschaft ein Anstieg der Spezifischen Aktivität auf das 25fache des Normalwerts (39). Ein Anstieg auf das 50fache des Ausgangswertes konnte nach parenteraler Östrogenzufuhr erreicht werden (40).

Es war Aufgabe dieser Arbeit, die 17ß-Hydroxysteroid: NAD-Oxydoreduktase (17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase) aus dem Myometrium des Kaninchens anzureichern und ihre Eigenschaften zu studieren.

MATERIAL UND METHODEN

REAGENTIEN UND LÖSUNGEN

Alle Reagentien waren - soweit nicht anders angegeben - vom Reinheitsgrad "pro analysi" (Fa.E.MerckAG). Thioglykol reinst (Fa.Th.Schuchardt) wurde vor Verwendung im Vakuum destilliert.

Tris-(Hydroxymethyl-aminomethan), Nicotinsäureamid-adenindinucleotid-phosphat (NADP), Nicotinsäureamid-adenindinucleotid (NAD) und reduziertes Nicotinsäureamid-adenindinucleotid (NADH) wurden von Fa.Boehringer und Söhne, Azetylpyridin-NAD und Testosteron von Mann Research Laboratories, Östron und 17ß-Östradiol von Sigma Chem.Comp., Östron-4C^{14} und 17ß-Östradiol-16C^{14} von The Radiochemical Centre, Testosteron-4C^{14} von New England Nuclear Corp. und p-Chlormercuribenzoesäure sowie o-Jodoso-benzoesäure von Fa.Fluka geliefert. Die Dextrangele Sephadex G50, G 75 und G 100 wurden von Fa. Pharmacia bezogen.

Die Aufarbeitung des Materials erfolgte unter Verwendung der von JARABAK, ADAMS, WILLIAMS-ASHMAN und TALALAY (37) angegebenen, glyzerinhaltigen, wässrigen Lösungen:

	Kaliumphosphat	EDTA	Thioglykol	Glyzerin	
Medium A	0,01 m	0,005 m	0,007 m	20%	7
Medium B	0,01 m	0,005 m	0,007 m	50%	7
Medium C	0,005 m	0,001 m	0,007 m	20%	7

Alle Schritte wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei 0 - 4°C durchgeführt.

VERSUCHSTIERE

Weibliche Kaninchen wurden, unmittelbar nachdem sie geworfen hatten, durch Genickschlag getötet und die beiden Uterushörner sofort entnommen.

GEWEBEAUFBEREITUNG

Das Myometrium wurde sorgfältig von Fett und Bindegewebe sowie von Plazentaresten und anhaftender Dezidua befreit und 2x je 5 sec (Ultra Turrax Typ 18/2) mit der 3fachen Menge Medium A homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden vom löslichen Protein durch Zentrifugieren (30 Min. 11000 x g; T=O°C) abgetrennt.

1. AMMONIUMSULFATFÄLLUNG

Der Überstand des Homogenates wurde langsam mit festem Ammoniumsulfat unter ständigem Rühren bis zu einer Sättigung von 60% gebracht, wobei mit NH_4OH etwa pH 7 eingehalten wurde. Nach 60 Min. Rühren wurde zentrifugiert (30 Min. 11000 x g; T=0°C). Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag in etwa 10 ml Medium B aufgenommen: Fraktion AS I. Die von 6 Tieren erhaltenen Fraktionen AS I wurden vereinigt und gemeinsam weiterverarbeitet.

DIALYSE

Je 30 ml Proteinlösung AS I wurden durch 3x je 12 - 20 Stunden Dialyse gegen je 2,3 l Medium C von $(NH_4)_2SO_4$ befreit. Die Entsalzung wurde durch Leitfähigkeitsmessung kontrolliert. Anfangswert 5 x 15 mS, Endwert 4 x 5 µS (das entspricht der Leitfähigkeit von MediumC).

2. AMMONIUMSULFATFÄLLUNG

Die dialysierte Eiweißlösung AS I wurde unter ständigem Rühren mit kaltgesättigter Ammoniumsulfatlösung auf 25% Sättigung gebracht. Nach 60 Min. Rühren wurde 30 Min. bei 11000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen. Der Überstand wurde mit gesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung bis 47% Sättigung mit Ammoniumsulfat gebracht, wie oben zentrifugiert und der dabei abgesetzte Niederschlag in Medium C gelöst: Fraktion AS II. Der Überstand wurde verworfen.

1. GELFILTRATION AN SEPHADEX G 100

Das trockene Dextrangel wurde 3 Tage lang mit einem Überschuß Wasser versetzt, mehrfach aufgerührt und der trübe Überstand nach Sedimentation des Gels jeweils dekantiert. Das fertig gequollene Gel wurde mehrmals mit einem Überschuß Medium C versetzt und kräftig gerührt. Nach Einfüllen des so behandelten Gels in eine Säule von 2,5 cm ∅ und 45 cm Höhe (18"Sephadex Chromatographierohr, Vol = 205 ml, V_o=60 ml) wurde solange mit Medium C nachgewaschen, bis die Extinktion bei 260 und 280 mμ im Eluat gleich der von Medium C war.

Wenn nicht anders angegeben, wurden bei Raumtemperatur ($T=20^{\circ}$) jeweils 5 - 15 ml Proteinlösung AS II mit einem Proteingehalt von 6 - 9 mg/ml auf die Säule gegeben. Nach dem Einsinken der Eiweißlösung wurde mit Medium C eluiert. Das Eluat wurde in 6 ml - Fraktionen aufgefangen. Die Bestimmung der Extinktion 254 mμ erfolgte mit Hilfe des Uvicord 4701 A (LKB Produkter).

2. GELFILTRATION AN SEPHADEX G 100

Die enzymatisch aktiven Fraktionen aus der 1. Gelfiltration wurden vereinigt und nach Konzentrieren einer erneuten Gelfiltration an Sephadex G 100 unterworfen. Das Konzentrieren der Proteinlösungen erfolgte entweder durch Versetzen mit gesättigter Ammonsulfatlösung bis zu einer Sättigung von 60%, anschließendem Zentrifugieren (11000 x g) und Auflösen des Niederschlags in Medium C oder mit Hilfe eines Ultrafilters (6300 A, LKB Produkter).

BESTIMMUNG DES EIWEISSGEHALTES

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Lösungen erfolgte entweder mit Hilfe der Biuret-Methode (3) oder bei geringeren Proteinkonzentrationen mittels UV-Messung nach KALCKAR (24) (Zeiss PMQ 2).

MESSUNG DER ENZYMAKTIVITÄT

Die Messung der Aktivität der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase erfolgte
A) durch Bestimmung des während der enzymatischen Inkubation umgesetzten Substrates (Östron) oder
B) durch Bestimmung des während der enzymatischen Inkubation hydrierten Cofaktors (NAD) im optischen Test auf NADH nach O. WARBURG.

A) Folgende Reagentien wurden in wässriger Lösung mit 0,2 - 0,5 ml Enzym inkubiert: 300 µM Tris/HCl, 1,0 µM NAD, 0,27 µM 17ß-Östradiol, 0,03 µM 17ß-Östradiol-16C^{14} in 0,1 ml Äthanol. pH = 9,5, Gesamtvolumen 3,0 ml, T = 25°C.

Die enzymatische Reaktion wurde durch 5 malige Extraktion der Ansätze mit je 3 ml Äther/Chloroform (3 : 1) beendet. Die vereinigten Extrakte eines jeden

Ansatzes wurden unter vermindertem Druck im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht und in 0,5 ml Äthanol aufgenommen. 0,2 ml der äthanolischen Steroidlösung wurden auf 3 cm breite Papierstreifen aufgetragen (Chromatographiepapier 2043 MgI, Schleicher & Schüll). Danach wurden die Streifen mit 20% Formamid in Methanol imprägniert und für 2 1/2 Std. absteigend im System Benzol/Chloroform (4 : 1, mit Formamid gesättigt) chromatographiert. Die Radioaktivität der C^{14}-Steroide wurde mit Hilfe eines fensterlosen Methandurchflußzählers (Frieseke & Höpfner, Typ FH 49) gemessen und von einem Schreiber registriert. Die Flächen der einzelnen Peaks (Östradiol-C^{14}, Östron - C^{14}) wurden planimetrisch bestimmt und aus dem Verhältnis dieser Flächen zueinander der Umsatz von Östradiol zu Östron berechnet.

B) Die Bestimmung der Enzymaktivität mit Hilfe des optischen Tests erfolgte in folgendem Ansatz in wässriger Lösung:
300 µM Tris/HCl pH 9,5, 20 mg Serumalbumin (Fa. Behring) 1,0 µM NAD, 0,3 µM 17ß-Östradiol in 0,1ml Äthanol und einem aliquot Enzym. Gesamtvol. = 3,0 ml, T=25°, d= 1 cm. Bestimmung der Extinktionsänderung bei 366 mµ im Photometer Eppendorf.

DEFINITION DER ENZYMAKTIVITÄT

Als eine Enzymeinheit wurde diejenige Menge Enzym definiert, die 1mµM Östradiol in 60 Min. in Östron umwandelt.

$$1 \text{ Enzymeinheit} = \frac{1 \text{ m}\mu\text{M Östron}}{\text{h}}$$

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\text{m}\mu\text{M Östron}}{\text{h} \times \text{mg Protein}}$$

ERGEBNISSE

BESTIMMUNG DER GÜNSTIGSTEN HOMOGENISIERDAUER

In Vorversuchen wurde die günstigste Homogenisierdauer bestimmt. Es zeigte sich nach Tabelle I bei zunehmender Dauer des Homogenisierens ein starker Temperaturanstieg. Die Ausbeute an löslichem Protein blieb auch bei kurzen Homogenisierzeiten gut. Es wurde deshalb zweimal je 5 sec. unter Kühlung im Eiswasserbad homogenisiert.

Homogenisierdauer (sec)	T ohne Kühlg. (°C)	T mit Kühlg. (°C)	Gesamtmenge Protein im Überstand (mg)
Plazenta:			
5	+ 10,7	+ 8,0	22,7
10	+ 11,6	+ 9,9	23,7
15	+ 14,4	+ 11,9	26,4
20	+ 17,5	+ 13,5	25,8
Muskel:			
5		+ 5,0	23,4
10		+ 5,5	26,6
15		+ 7,6	23,6
20		+ 11,3	21,2

Tabelle I. Abhängigkeit der Temperatur von der Dauer des Homogenisierens. Je 1 g Skeletmuskulatur vom Meerschweinchen bzw. menschlicher Plazenta und 5ml Med.A wurden mit und ohne Kühlung im Eiswasserbad homogenisiert und die Erwärmung gemessen. Nach dem Zentrifugieren bei 11000 x g wurden Menge und Proteingehalt des Überstandes bestimmt (Biuret-Methode).

BESTIMMUNG DER GÜNSTIGSTEN ZENTRIFUGIER-BESCHLEUNIGUNG

Zur Bestimmung der optimalen Zentrifugierbeschleunigung wurde in Vorversuchen Plazenta-Homogenat (5g Plazenta und 30 ml Medium A, 2 x 5 sec Ultra Turrax) bei 1000 x g, 10000 x g usw. zentrifugiert. Es zeigte sich, daß auch bei höheren g-Zahlen der Proteingehalt im Überstand etwa konstant blieb.

Tabelle II zeigt die Proteinmenge und die Gesamtaktivität von Homogenat des Kaninchenmyometriums, das fraktioniert zentrifugiert wurde. Die Gesamtaktivität im Überstand blieb oberhalb 11000 x g annähernd konstant. Es wurde deshalb bei den weiteren Versuchen 30 Min. mit 11000 x g zentrifugiert.

Zentrifugier-beschleunigung	Überstands-volumen (ml)	Protein-gehalt (mg/ml)	Spez. Akt. ($\frac{\mu M \text{ Östron}}{h \times mg \text{ Prot.}}$)	Gesamtakt. ($\frac{\mu M \text{ Östron}}{h}$)
1000 x g	5,0	15,1	33,4	2510
11000 x g	5,2	14,8	44,2	3410
54000 x g	5,3	14,4	45,8	3560
105000 x g	5,5	14,3	51,4	4050

Tabelle II. Aktivität der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Kaninchenmyometrium in Abhängigkeit von der g-Zahl. 13,8 g Kaninchenmyometrium wurden mit 40 ml Medium A homogenisiert. Je 8 ml Homogenat wurden bei verschiedenen g-Zahlen je 30 Min. zentrifugiert.

HITZESCHRITT

Versuche, durch Hitzedenaturierung eine Anreicherung der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu erreichen, verliefen ohne befriedigendes Ergebnis. Bei Erhöhung der Temperatur auf 45°, 50° und 55°C und anschließendem

Zentrifugieren fand sich jeweils sowohl im Überstand als auch im Niederschlag Enzymaktivität. Eine Erhöhung der Spezifischen Aktivität konnte nicht erreicht werden.

FRAKTIONIERTE 2. AMMONIUMSULFATFÄLLUNG

Bei schrittweiser Erhöhung der Ammonsulfatkonzentration in dialysiertem Protein AS I aus Kaninchenmyometrium (siehe oben) wurde die Hauptmenge des enzymatisch aktiven Proteins etwa zwischen 25% und 47% Sättigung präzipitiert. Siehe Tabelle III und Abbildung 1.

$(NH_4)_2 SO_4$-Sättigung	Proteingehalt (mg/ml)	Spezif. Aktivität ($\frac{\mu M \text{ Östron}}{h \times mg}$)
0	7,8	111,0
0 - 24%	5,7	100,0
0 - 28%	4,9	92,5
0 - 32%	4,7	64,5
0 - 38%	3,7	39,5
0 - 43%	2,9	22,6
0 - 46%	2,6	20,4
0 - 47%	2,4	20,0
0 - 50%	1,8	18,5

Tabelle III. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung. Je 3 ml dialysierte Proteinlösung AS I wurden mit entsprechenden Mengen kaltgesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung (pH 7,0) unter Rühren versetzt und 30 Min. weitergerührt. Nach dem Abzentrifugieren (30 Min. 10000 x g) Bestimmung der Spezifischen Aktivität im Überstand. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

SEPHADEX GELFILTRATION

Durch Gelfiltration an Sephadex G 100 konnte das Enzymprotein von der Hauptmenge des enzymatisch inaktiven Pro-

teins, welches mit V_o eluiert wurde, getrennt werden (siehe Abb.2). Versuche mit Sephadex G 50 und Sephadex G 75 ergaben weniger günstige Resultate (siehe Abb. 8 Seite 22).

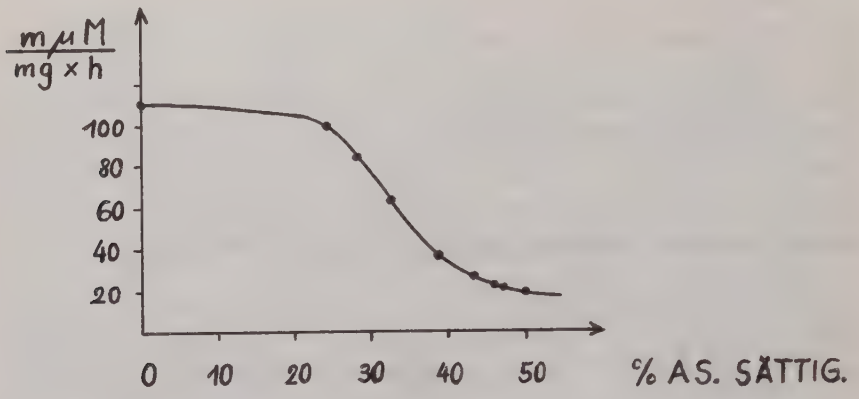

Abb.1. Abhängigkeit der Spezifischen Aktivität der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Überstand 11000 x g von der Ammonsulfatkonzentration. Methodische Einzelheiten siehe Tabelle III.

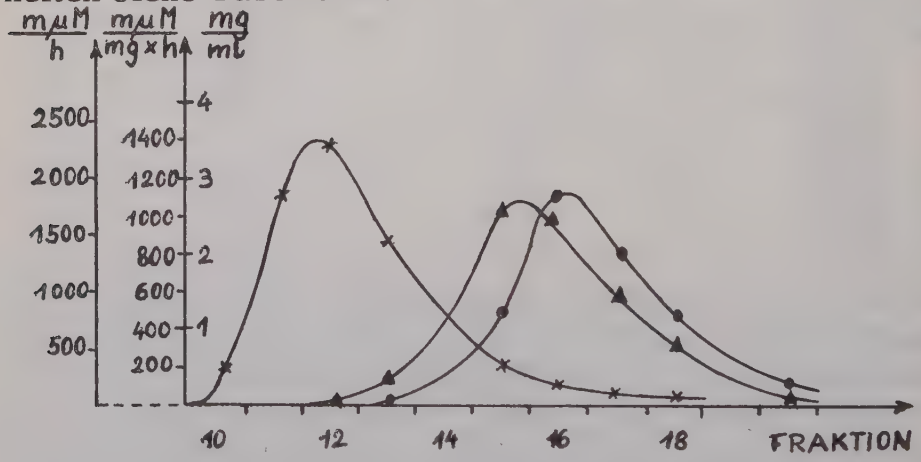

Abb.2. Gelfiltration mit Sephadex G 100. Eine 45 cm lange Säule von 2,5 cm ∅ mit dem Dextrangel (s.Methodik) wurde mit 10 ml Proteinlösung AS II (Proteingehalt 6,9 mg/ml, Spez. Akt. 166) beladen und mit Medium C eluiert. Auffangen von 6 ml-Fraktionen. Proteingehalt, Gesamtaktivität und Spezifische Aktivität wurden registriert.

Eiweißgehalt x—x; Spez.Akt.● — ●; Gesamtakt.▲ — ▲.

ANREICHERUNG DER 17ß-HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE AUS KANINCHENMYOMETRIUM

Kaninchenmyometrium wurde 2x je 5 sec mit der dreifachen Menge Medium A homogenisiert. Anschließend wurde 2 x mit Ammoniumsulfat fraktioniert: die erste Fällung zwischen 0 und 60% Sättigung (AS I) und nach Dialyse die zweite Fällung zwischen 25 und 47% Sättigung (AS II). Das Protein AS II wurde zweimal einer Gelfiltration an Sephadex G 100 unterworfen und auf eine Spezifische Aktivität von 5400 gebracht. In Tabelle IV ist die auf dem angegebenen Wege erzielte 94 fache Anreicherung zusammengefaßt.

Alle weiteren Untersuchungen wurden - soweit nicht anders vermerkt - mit dem gereinigten Enzymprotein durchgeführt.

Enzympräparation	Gesamtprotein (mg)	Gesamtakt. ($\frac{\text{muM Östron}}{\text{h}}$)	Spez.Akt. ($\frac{\text{muM Öst.}}{\text{h x mg}}$)	Ausbeute (%)	Anreicherung
Homogenatüberstand 11000 x g	1260	76200	60,8	(100)	-
1. Ammonsulf. Fällg. und Dialyse	680	59600	88	78	1,45
2. Ammonsulfat-Fällg.	182	29100	160	38	2,65
1. Sephadex Gelfiltr.	30,4	23600	781	31	13,8
2. Sephadex Gelfiltr.	4,14	22200	5365	29	94,0

Tabelle IV. Reinigung der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Kaninchenmyometrium am Ende der Tragzeit.

ABHÄNGIGKEIT DES STEROIDUMSATZES VOM VERWENDETEN PUFFERSYSTEM UND VON DER H-IONEN-KONZENTRATION

Mit verschiedenen Puffern wurde die Abhängigkeit des Substratumsatzes von der H-Ionen-Konzentration des Inkubationsansatzes bestimmt. Es zeigte sich - wie in Abb.3 zusammengestellt - daß das Optimum der enzymatischen Oxydation von Östradiol zu Östron etwa bei pH 9,4 lag. Bei Erhöhung des pH-Werts nahm die Spezifische Aktivität des Enzyms rasch ab.

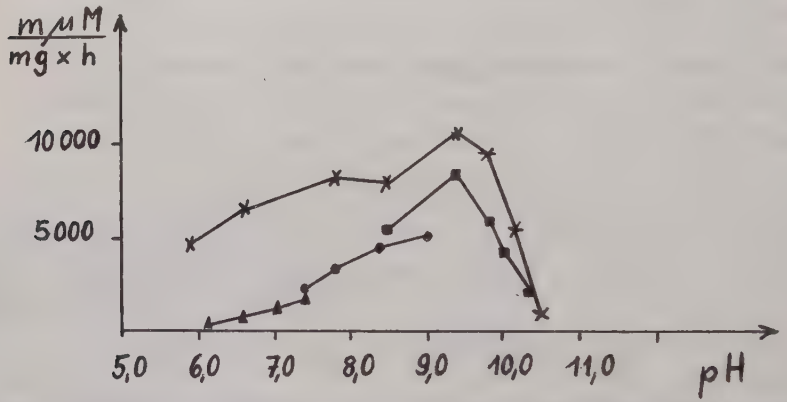

Abb.3. Abhängigkeit der enzymatischen Oxydation von Östradiol zu Östron von der H-Ionen-Konzentration. Testansatz: 0,27 µM 17ß-Östradiol, 0,03 µM 17ß-Östradiol-16C^{14}, 1,0 µM NAD, 0,1 - 0,2 ml (0,014 - 0,028 mg) Enzymprotein und 300 µM Puffer, pH wie angegeben, T = 25°, Vol. = 3,0 ml. Folgende Puffer wurden verwendet: Imidazol/HCl ▲ — ▲, Tris/HCl ● — ●, Glycin/NaOH ■—■ und Kaliumphosphat x — x.

Bei gleichem pH-Wert war der Substratumsatz mit Glycin/NaOH höher als mit Tris/HCl und mit Kaliumphosphat höher als mit Glycin/NaOH (Abb.3).

Durch Zusatz von Kaliumphosphat zu Tris/HCl und Imidazol/HCl konnte die enzymatische Oxydation von Östradiol zu Östron gesteigert werden (siehe Tabelle V). Die Erhöhung der Ionenstärke allein blieb ohne Effekt.

Puffer	Phosphat (µM)	pH-Wert	Spezifische Aktiv. ($\frac{muM}{h \times mg}$)
Imidazol/HCl	-	6,4	602
Imidazol/HCl	25	6,4	1065
Imidazol/HCl	50	6,4	1610
Imidazol/HCl	100	6,4	2250
Imidazol/HCl	200	6,4	2385
Imidazol/HCl	300	6,4	2625
-	300	6,4	4150
Tris/HCl 0,1m	-	7,4	1770
Tris/HCl 0,2m	-	7,4	1990
Tris/HCl 0,1m	50	7,4	2880
Tris/HCl 0,1m	100	7,4	3860
Tris/HCl 0,1m	200	7,4	4580
Tris/HCl 0,1m	300	7,4	5480
-	300	7,4	7600

Tabelle V. Abhängigkeit der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase von der Phosphatkonzentration. Zu üblichen Inkubationsansätzen mit Tris/HCl und Imidazol/HCl (Endkonzentration und pH wie angegeben) wurde Phosphat in steigender Konzentration zugesetzt. Inkubationsdauer 15 Min., Substrat: Östradiol-17ß. 0,2 ml Enzym.

Das Optimum der enzymatischen Reduktion von Östron zu Östradiol lag im schwach sauren Bereich bei pH 6,2. Auch hier war bei Verwendung von Kaliumphosphatpuffer

der Substratumsatz höher als bei Verwendung von Imidazol/HCl, Tris/HCl und Natriumcitrat/NaOH (siehe Abb.4).

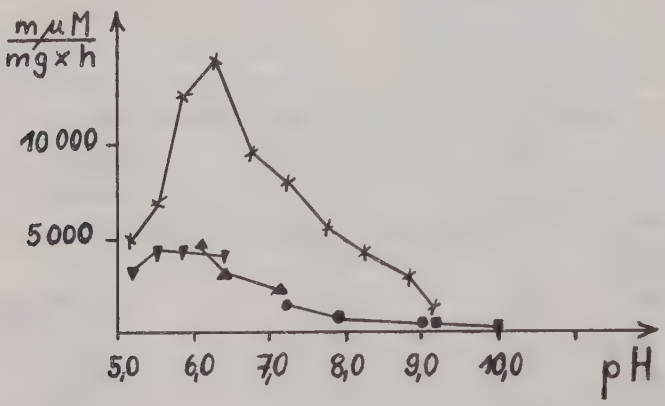

Abb. 4. Abhängigkeit der enzymatischen Reduktion von Östron von der Wasserstoffionenkonzentration. Testansatz: 0,27 μM Östron, 0,03 μM Östron-4C^{14}, 1,13 μM NADH, 0,1 - 0,2 ml (0,014 - 0,028 mg) Enzym und 300 μM Puffer, pH wie angegeben, T=25°C, Vol.= 3,0 ml. Folgende Puffer wurden verwendet: Imidazol/HCl ▲—▲, Tris/HCl ● — ●, Glycin/NaOH ■—■, Kaliumphosphat x — x und Natriumcitrat/NaOH ▼—▼ .

ABHÄNGIGKEIT DES SUBSTRATUMSATZES VON DER SUBSTRATKONZENTRATION

a) Die Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Konzentration des Substrates Östradiol zeigt Abbildung 5 in Form der LINEWEAVER-BURK - Transformation, Abb.6 in direkter Auftragung. Bei einem pH-Wert von 9,5 wurde daraus die MICHAELIS-MENTEN -Konstante zu K_m = 8 x 10^{-6} M/l bestimmt (T = 25°C).

Anmerkung: Eine eventuelle Begrenzung der Reaktionsgeschwindigkeit durch begrenzte Substratlöslichkeit konnte durch Zusatz von Serumalbumin zum Inkubationsansatz ausgeschlossen werden.

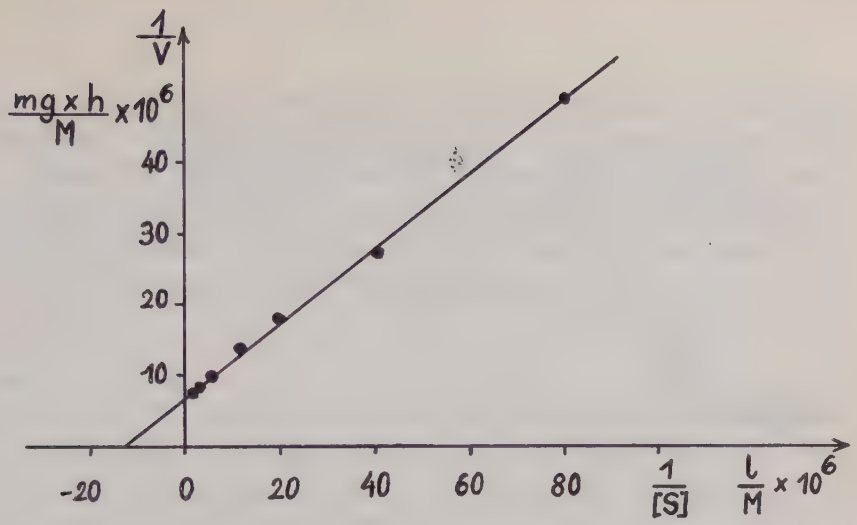

Abb.5. Oxydation von Östradiol zu Östron durch die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase in Abhängigkeit von der Konzentration des Substrates. Verschiedene Mengen Östradiol (0,0037 - 0,3 µM) wurden in 0,1 m Phosphat-Puffer pH 9,5 mit 1,0 µM NAD und 0,028 mg Enzym 5 Min. inkubiert. Bestimmung des Steroidumsatzes in üblicher Weise (siehe Methodik).

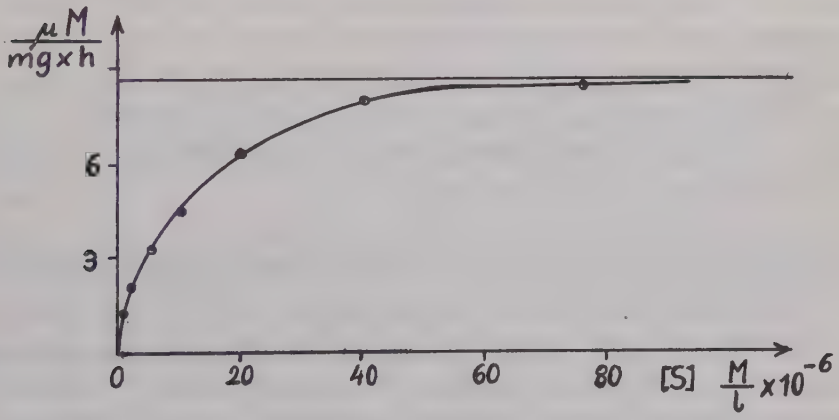

Abb.6. Abhängigkeit des Steroidumsatzes von der Substratkonzentration. Inkubation wie Abb. 5.

b) Bei der enzymatischen Reduktion von Östron zu Östradiol wurde die MICHAELIS-MENTEN-Konstante aus einer Inkubationsreihe mit steigenden Mengen Östron als Substrat errechnet. Aus der Auftragung in Form der LINE-WEAVER-BURK-Transformation (Abb.7) wurde K_m zu $2,4 \times 10^{-4}$ M/l bestimmt; pH = 6,2, T = 25°C.

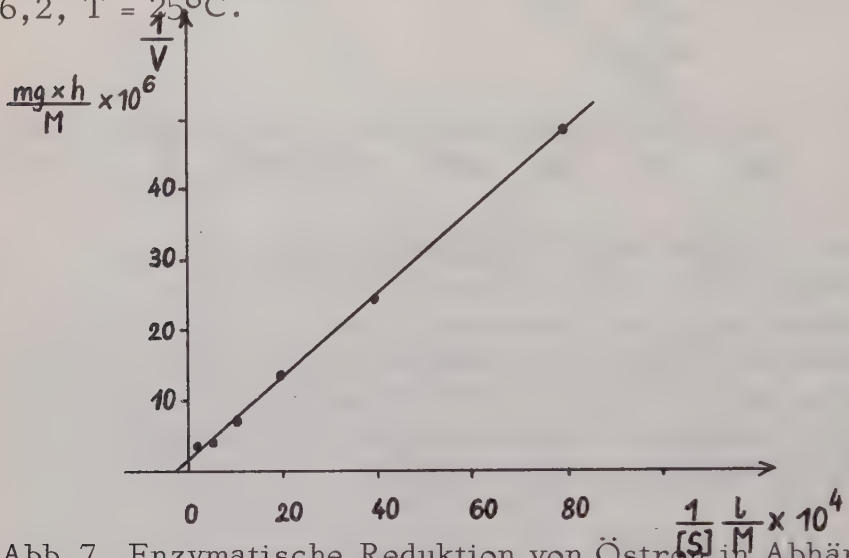

Abb.7. Enzymatische Reduktion von Östron in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. 0,037 - 0,3 µM Östron wurden in 0,1 m Phosphatpuffer pH 6,2 mit 1,13 µM NADH und 0,028 mg Enzym 5 Min. inkubiert. T = 25°, Vol = 3,0 ml. Bestimmung des Steroidumsatzes in üblicher Weise (siehe Methodik).

SUBSTRATSPEZIFITÄT DER 17ß-HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE

Zur Prüfung der Substratspezifität wurde das gereinigte Enzym aus Myometrium mit Testosteron-$4C^{14}$ als Substrat und NAD als Coenzym inkubiert. Nach 20 Min. Inkubation konnte eine Oxydation von Testosteron zu Androst-4en-3,17-dion nicht nachgewiesen werden (siehe Tab. VI).

Substrat	Inkubat.zeit (Min.)	Enzym (mg)	umgesetztes Substrat (mµM)
Testosteron	0	0	0
Testosteron	0	0,056	0
Testosteron	20	0,056	0
Östradiol	0	0,056	0
Östradiol	20	0,056	111,8

Tabelle VI. Prüfung der Substratspezifität der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase.
Testansatz: 300 µM Kaliumphosphat pH 9,3, 1,0 µM NAD, 0,27 µM Testosteron, 0,03 µM Testosteron-$4C^{14}$, 0,056mg Enzymprotein, Inkubationsdauer 20 Min. T=25°, Vol=3,0ml Extraktion der Ansätze mit Äther/Chloroform 3 : 1, Chromatographie absteigend im System Benzol/Cyclohexan/Formamid 1 : 1. Kontrolle gegen sofort denaturierten kompletten Testansatz und Testansatz ohne Enzym.

EINFLUSS DES COFAKTORS AUF DIE ENZYMATISCHE REAKTION

Bei der enzymatischen Oxydation von Östradiol zu Östron kann die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase neben NAD auch NADP und Azetylpyridin-NAD als Cofaktoren verwenden. Bei pH 9,5 ist sowohl in Tris/HCl- als auch in Phosphatpuffer der Substratumsatz mit NAD größer als mit NADP und Azetylpyridin-NAD. Bei Verwendung von Tris/HCl-Puffer pH 6,9 ist dagegen der Substratumsatz mit NADP höher als mit NAD, siehe Tabelle VII.

Puffer	pH	Cofaktor	umgesetztes Steroid (mµM)
Tris/HCl	9,5	NAD	11,5
Tris/HCl	9,5	NADP	9,4
Phosphat	9,5	NAD	22,8
Phosphat	9,5	NADP	18,6
Phosphat	9,5	Azetylpyridin-NAD	14,3
Tris/HCl	6,9	NAD	11,8
Tris/HCl	6,9	NADP	15,4

Tabelle VII. Einfluß des Cofaktors auf den Substratumsatz. 1,0 µM NAD bzw. 1,13 µM NADP oder 1,9 µM Azetylpyridin-NAD, 0,27 µM 17ß-Östradiol, 0,03 µM Östradiol-16C^{14} und 0,014 mg Enzym wurden jeweils 15 Min. in 0,1 m Puffer inkubiert. Bestimmung des Steroidumsatzes in üblicher Weise.

NACHWEIS VON SULFHYDRYLGRUPPEN

Als spezifische Sulfhydrylgruppen - Blocker dienten p-Chlormercuribenzoesäure und o-Jodosobenzoesäure. Sie wurden in 0,1 n KOH gelöst und den Inkubationsansätzen zugegeben. Wie die Ergebnisse aus Tabelle VIII zeigen, besitzt die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus dem Myometrium funktionelle SH-Gruppen. Das Enzym wird durch 10^{-4}m p-Chlormercuribenzoesäure zu etwa 98 % und durch 10^{-2}m o-Jodosobenzoesäure zu 88% seiner ursprünglichen Aktivität gehemmt.

p-Chlormercuri-benzoesäure (M/l)	o-Jodoso-benz.sre. (M/l)	Spez.Akt. ($\frac{\mu M \text{ Östron}}{h \times mg}$)	Enzymhemmung %
-	-	7550	0
10^{-5}	-	6020	20,0
10^{-4}	-	467	97,8
10^{-3}	-	0	100,0
-	10^{-5}	6800	10,0
-	10^{-4}	5550	26,5
-	10^{-3}	1880	75,0
-	10^{-2}	935	87,6

Tabelle VIII. Hemmung der Aktivität der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase durch SH-Gruppenblocker. p-Chlormercuribenzoesäure und o-Jodosobenzoesäure (in 0,1 n KOH) wurden in der angegebenen molaren Endkonzentration folgendem Inkubationsansatz zugesetzt:
1,0 µM NAD, 0,27 µM 17ß-Östradiol, 0,03 µM Östradiol-16C^{14} und 0,1 m Phosphatpuffer, dessen pH-Wert so gewählt wurde, daß der pH im Inkubationsansatz etwa 8,8 betrug. Die Reaktion wurde mit 0,014mg Enzym gestartet.

VERSUCHE ZUR BESTIMMUNG DER MOLEKÜLGRÖSSE DER 17ß-HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE

Aus dem Verhalten von Proteinen bei der Gelfiltration mit Dextrangelen sind Rückschlüsse auf die Molekülgröße möglich (24,25,58). Bei der Gelfiltration an

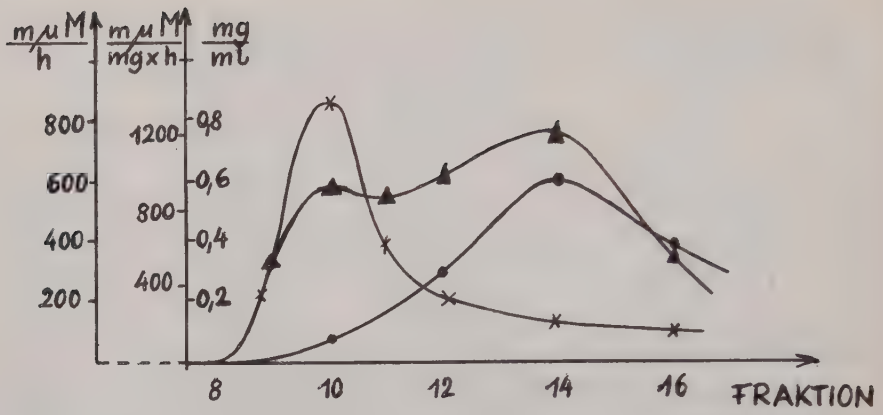

Abb. 8. Gelfiltration an Sephadex G 75.
Präparation des Gels und Säulenmaße siehe Methodik. Beladen mit 5 ml Protein AS II, Proteingehalt 6,06 mg/ml, Spezifische Aktivität 42,8 mμM/h x mg. Elution mit Medium C. Auffangen von 6 ml-Fraktionen. Registrierung von Proteingehalt, Gesamtaktivität und Spezifischer Aktivität der Fraktionen.

Proteingehalt x — x
Gesamtaktivität ▲ — ▲
Spezifische Aktivität ● — ●

Sephadex G 50 (Fraktionierungsbereich Molekulargewicht 500 - 10000) wurde das gesamte enzymatisch aktive Protein der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase mit V_o, dem Flüssigkeitsvolumen außerhalb der Gelkörner, eluiert. Das geschieht nur mit Substanzen, deren Molekulargewicht oberhalb der Ausschlußgrenze liegt. Bei der Verwendung von Sephadex G 75 (Fraktionierungsbereich 1000 - 50000) wurde das Enzymprotein nur unvollständig vom enzymatisch inaktiven Protein, das mit V_o eluiert wurde, abgetrennt (Abb.8).

Mit Sephadex G 100 (Fraktionierungsbereich 1000 - 100 000) dagegen ließ sich das Enzym vollständig von dem mit V_o eluierten nicht aktiven Protein abtrennen (siehe Abb.2 Seite 12). Auf Grund dueser Versuche muß angenommen werden, daß das Molekulargewicht der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1000 bis 50 000 beträgt.

DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, daß sich in der cytoplasmatischen Fraktion von Kaninchenmyometrium eine 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase befindet, die mit Östradiol bzw. Östron als Substrat und NAD oder NADP als Cofaktoren reagiert.

Das Enzym ließ sich in vier Schritten etwa 100 fach anreichern. Dadurch werden die Versuchsergebnisse von JENSEN (38) mit Rattenuteri eingeschränkt. JENSEN konnte bei parenteraler Applikation von markiertem Östradiol und auch Östron nur das jeweils verabreichte Östrogen im Rattenuterus nachweisen. Er nahm an, daß Erfolgsorgane der Östrogene ganz allgemein nicht in der Lage seien, die Oxydation oder Reduktion von Östradiol in Östron und umgekehrt durchzuführen. Für das Myometrium von Kaninchen läßt sich diese Aussage nicht bestätigen.

Die Anreicherung des Enzyms aus dem Homogenat von Kaninchenmyometrium erfolgte durch zweimalige Fällung mit Ammoniumsulfat und durch zweimalige Gelfiltration mit Sephadex G 100.

Die fraktionierte 2.Ammonsulfatfällung (Fraktionierungsgrenzen 25% Sättigung und 47% Sättigung) ergab eine Anreicherung um den Faktor 2,5 bei einer Ausbeute von 38% der eingesetzten Enzymaktivität. Es fragt sich, ob bei der relativ geringen Anreicherung der hohe Verlust an Gesamtaktivität vertretbar ist.

Der Versuch einer Reinigung des Enzyms durch Hitzedenaturierung verlief unbefriedigend.

Die Gelfiltration mit Sephadex G 100 brachte mit jedem Schritt hohe Anreicherung (etwa Faktor 6) bei nur 4% Verlust an Gesamtaktivität. Infolge der Stabilität des

Enzyms in glycerinhaltigen Lösungen konnten diese Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Die von anderen Autoren erzielte Reinigung der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus verschiedenem Ausgangsmaterial war meist geringer als bei dem Enzym aus Myometrium. So wurde das Enzym aus Pseudomonas testosteroni von DELIN und PORATH (17) 10fach, aus der Rattenniere von BREUER (8) 12 fach und aus menschlicher Plazenta von LANGER und ENGEL (48) 50 fach angereichert. Aus menschlicher Plazenta konnten jedoch JARABAK, ADAMS, WILLIAMS-ASHMAN und TALALAY die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2500 fach anreichern (37).

Die Schwierigkeiten bei der Reinigung des Enzyms aus Myometrium liegen vor allem in der schweren Zugänglichkeit des Ausgangsmaterials (schwangere Kaninchen am Ende der Tragzeit) und der relativ geringen Ausbeute an löslichem Protein (25 mg Protein aus 1 g Muskelgewebe).

Mit Östradiol als Substrat betrug die MICHAELIS-MENTEN - Konstante bei pH 9,5 und NAD als Cofaktor $K_m = 8 \times 10^{-5}$m, mit dem Substrat Östron bei pH 6,2 und NADH als Cofaktor $K_m = 2,4 \times 10^{-4}$M/l. Sie liegt damit in der gleichen Größenordnung wie bei anderen bisher untersuchten Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. So gaben BREUER und DAHM die MICHAELIS-MENTEN-Konstante für die 17ß- Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus der Rattenniere bei pH 8,6 mit $18,5 \times 10^{-5}$M/L, aus der Rattennebenniere bei pH 8,8 mit $2,3 \times 10^{-4}$M/l an.

Während die meisten Autoren 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen beschrieben, die mit Testosteron als Substrat reagieren (8,14,29,45), wurde mit der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus dem Myometrium praktisch keine Umwandlung von Testosteron zu Androst-4en-3,17-dion gefunden.

Der Nachweis von Sulfhydrylgruppen gelang bei der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Myometrium durch Hemmung der Aktivität des Enzyms mit p-Chlormercuribenzoesäure in einer Konzentration von 10^{-3} - 10^{-5} und o-Jodosobenzoesäure in Konzentrationen von 10^{-2} - 10^{-5}m. Mit 10^{-4}m p-Chlormercuribenzoesäure wurde eine Hemmung von etwa 98%, mit 10^{-3}m o-Jodosobenzoesäure eine Hemmung von 75% der ursprünglichen Aktivität des Enzyms erreicht. BREUER, DAHM, TALALAY et al. kommen zu ähnlichen Ergebnissen und geben die gleichen Hemmkonzentrationen für die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase an (8,14,53,69). STEMPFEL und Mitarbeiter fanden bei den 3,17-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen aus Pseudomonas testosteroni eine Hemmung der ß-Aktivität mit p-Hydroxymercuribenzoat nur bis zu maximal 40% der Ausgangsaktivität.

Das pH-Optimum der enzymatischen Oxydation lag bei einem pH-Wert von 9,4 während die Reduktion bei etwa pH 6,2 mit größter Geschwindigkeit erfolgte. BREUER gibt für die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus der Rattenniere (8) für die Oxydation ein pH-Optimum von 8,7, für die Reduktion von pH 6,6 an. Auch die Angaben aus dem Arbeitskreis von KOCHAKIAN (3) über einen optimalen pH-Wert von 9,6 für die Δ^5,3ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase stimmen mit den vorliegenden Ergebnissen überein.

Neben der Wasserstoffionenkonzentration beeinflußte auch der verwendete Puffer allein die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion. Bei der Verwendung von 0,1 m Phosphat war der Steroidumsatz 1,5 - 3 mal so hoch wie mit den anderen Puffern (Tris/HCl, Glycin/NaOH, Imidazol/HCl, Natriumcitrat/NaOH). Durch diese Beobachtung werden die Angaben von PORTIUS und REPKE bestätigt. Sie fanden ebenfalls eine beschleunigte Steroidumsetzung durch die Östradiol-Dehydrogenase aus Erythrozyten bei Inkubation in

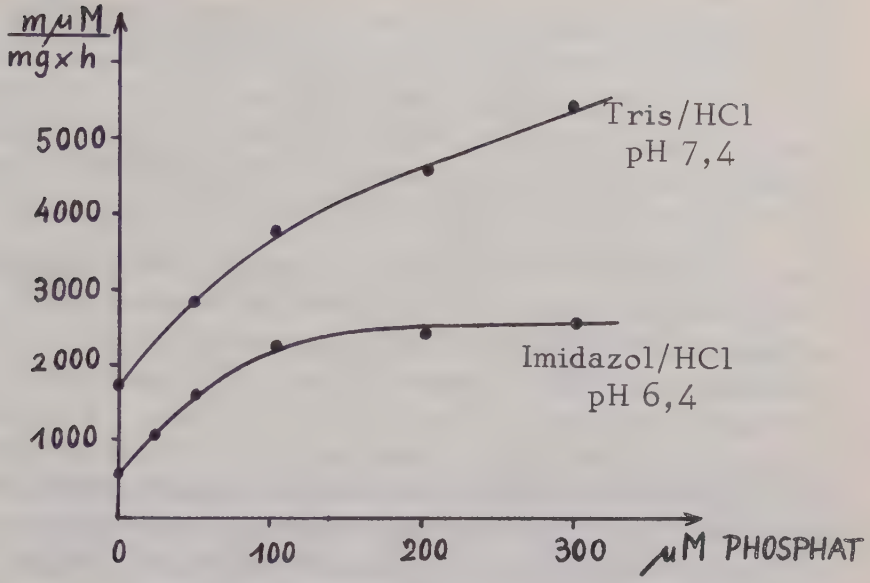

Abb.9 Abhängigkeit der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase von der Phosphatkonzentration. Versuchsanordnung siehe Tabelle V, Seite 15.

Phosphatpuffer (60). Durch Zusatz von anorganischem Phosphat zu anderen Puffern (Tris/HCl, Imidazol/HCl, siehe Tabelle V, Seite 15, Abb.9, Seite 27) konnte der Substratumsatz in Abhängigkeit von der Konzentration an Phosphat gesteigert werden.

Besonders stark war der Einfluß von Phosphat bei der enzymatischen Reduktion von Östron zu Östradiol; hier war der Steroidumsatz mit Tris/HCl-, Imidazol/HCl-, Glycin/NaOH- und Natriumcitrat/NaOH-Puffer nur etwa halb so groß wie bei der Oxydation von Östradiol. Mit Phosphatpuffer dagegen überstieg der Steroidumsatz bei der Reduktion den Wert bei der Oxydation.

Als Ursache für diese Befunde ließe sich eine Hemmung des Enzyms durch Tris/HCl-, Imidazol/HCl-, Glycin/NaOH-Natriumcitrat/NaOH-Puffer diskutieren. Hiergegen ist jedoch einzuwenden, daß eine Erhöhung der Pufferkonzentration auf das doppelte den Steroidumsatz nicht beeinflußte. Andererseits könnte Phosphat eine Aktivierung des Enzyms hervorrufen. Dafür würde die Proportionalität zwischen zugesetzter Kaliumphosphatmenge und Steroidumsatz sprechen (siehe Abb.9).

Das Verhalten der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Myometrium bei der Gelfiltration erlaubt Rückschlüsse auf die Größe des Enzymmoleküls. Wie aus den Arbeiten von PORATH u.a. (24,25,58) hervorgeht, werden Stoffe infolge des "Molekülsiebeffektes" der Dextrangele in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße eluiert, wobei eine Fraktionierung nur dann erfolgen kann, wenn die Größe des oder der Moleküle unterhalb der für jedes verwendete Gel charakteristischen Ausschlußgröße liegt.

Bei der Filtration mit Sephadex G 50 (Ausschlußgrenze Molekulargewicht 10 000) wurde das enzymatisch aktive Protein nicht von der Hauptmenge des mit V_o eluierten Proteins abgetrennt. Mit Sephadex G 75 (Ausschlußgrenze Molekulargewicht 50 000) erfolgte die Trennung von aktivem und inaktivem Protein nur teilweise, während bei der Verwendung von Sephadex G 100 (Ausschlußgrenze Molekulargewicht 100 000) eine vollständige Trennung des Enzymproteins vom inaktiven Protein möglich war.

Auf Grund dieser Versuche kann angenommen werden, daß das Molekulargewicht der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus dem Myometrium von Kaninchen etwa 10 000 bis 50 000 beträgt.

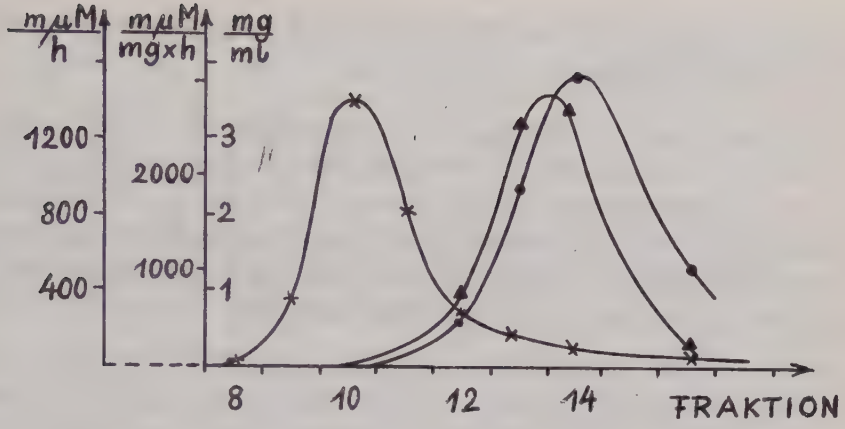

Abb.10. Sephadex G 100-Gelfiltration mit plazentarem Enzym nach der 2. Ammoniumsulfatfällung. 5 ml Protein (9,3 mg/ml, 160 mμM/mg x h) wurden aufgegeben, mit Medium C eluiert und wie oben 6 ml-Fraktionen aufgefangen.
Proteingehalt x — x; Gesamtakt. ▲ — ▲ ; Spez.Akt. ● — ●

Um die Molekülgrößen der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen aus Myometrium und aus menschlicher Plazenta miteinander vergleichen zu können, wurde das Enzym aus menschlicher Plazenta dem gleichen Reinigungsverfahren unterworfen wie die Dehydrogenase aus Myometrium (Homogenat, 2 x Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration).

Bei der Gelfiltration mit Sephadex G 100 fand sich kein Unterschied zwischen den beiden Enzymen. Beide Enzyme zeigten bei Einhaltung der gleichen technischen Bedingungen (Säulenquerschnitt, Füllhöhe, Durchflußgeschwindigkeit, Volumen der aufgefangenen Fraktionen) ein identisches Fraktionierungsschema (vergleiche Abb.2, Seite 12 und Abb.10, Seite 29). Man darf daher annehmen, daß

die Molekülgrößen des Enzyms aus Plazenta und Myometrium etwa übereinstimmen.

In diesem Zusammenhang sind Versuche von DELIN und PORATH (17) zu erwähnen, die bei der Gelfiltration von Extrakten aus Pseudomonas testosteroni ein ähnliches Elutionsschema für die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Mikroorganismen fanden wie für das Enzym aus Warmblüterorganen, über das hier berichtet wurde.

ZUSAMMENFASSUNG

Die cytoplasmatische Fraktion von Kaninchenmyometrium enthält ein 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, die mit Östradiol als Substrat und NAD, NADP und Azetylpyridin-NAD als Cofaktoren reagiert. Die Molekülgrösse beträgt 10000 bis 50000.

Das Enzym wurde nach zweimaliger Ammoniumsulfatfällung und zweimaliger Gelfiltration mit Sephadex G 100 etwa 100 fach angereichert.

Das Optimum für die enzymatische Oxydation von Östradiol zu Östron liegt bei pH 9,4, das pH-Optimum für die Reduktion von Östron zu Östradiol bei pH 6,2.

Die MICHAELIS-MENTEN-Konstante beträgt mit Östradiol als Substrat bei pH 9,5 und T = 25°C 8×10^{-6} M/l, mit Östron als Substrat $2,4 \times 10^{-4}$M/l bei pH 6,2 und T=25°.

Die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase besitzt funktionelle Sulfhydrylgruppen.

Die Aktivität des Enzyms wird durch Zusatz von anorganischem Phosphat gesteigert.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Bickenbach für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes in seiner Klinik danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jütting für die fachliche Beratung und Förderung der Arbeit sowie Fräulein Enderle für technische Ratschläge.

LITERATUR

1 ABE, T., D.D. HAGERMAN, and C. VILLEE: Estrogen Dependent Pyridine Nucleotide Transhydrogenase of Human Myometrium. J. Biol. Chem. 239 (1964) 414.

2 ADAMS, J.A., J. JARABAK, and P.TALALAY: The Steroid Specificity of the 17ß-Hydroxysteroid Dehydrogenase of Human Placenta. J. Biol. Chem. 237 (1962) 3069.

3 AOSHIMA, Y., C.D. KOCHAKIAN, and JADRIJEVIC: TPN- and DPN-Specific 3α-Hydroxy- and Δ5-3ß-Hydroxysteroid Dehydrogenases of Liver and Kidney. Endocrinology 74 (1964) 521.

4 BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK, K.H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT, G. PFLEIDERER: Diphospho-Fruktose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. 8b (1953) 555.

5 BERGMEYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1962.

6 BETTENDORF, G.: Diskussionsbemerkung in 40.

7 BISCHOFF, F., R.E. KATHERMAN, and Y.S.Yee: Activation of Estrone by Mammalian Red Cells. Am. J. Physiol. 164 (1951) 774.

8 BREUER, H., K.DAHM: Anreicherung und Charakterisierung einer 17ß-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase der Rattenniere. Bioch. Biophys. Acta 85 (1964) 29.

9 BREUER,H., R.OZON, C.MITTERMAYER:
Untersuchungen über den Stoffwechsel von Steroidhormonen bei Vertebraten. I. Vorkommen von Hydroxysteroid-Dehydrogenasen bei Fischen und Amphibien. Hoppe-Seyler's Z.f.phys.Chem. 333 (1963) 272.

10 BREUER,H., R.OZON, C. MITTERMAYER:
Untersuchungen über den Stoffwechsel von Steroidhormonen bei Vertebraten. II. Hydroxylierung von Östradiol-17ß zu 6 -Hydroxyöstradiol-17ß und Östriol in der Leber von Amphibien. Hoppe-Seyler's Z.f.phys.Ch. 333(1963) 282.

11 BREUER,H., K. DAHM:
Aktivität von Steroidenzymen in dem durch 7,12-Dimethylbenzanthrazen induzierten Mammacarcinom der Ratte. Naturw. 53 (1966) 203.

12 BURTON,A.F.:
Inhibition of 11ß-Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Rat and Mouse Tissues in Vitro and in Vivo. Endocr. 77 (1965) 325.

13 COLOWICK,S.P., N.O. KAPLAN,E.F. NEUFELD, and M.M. CIOTTI:
Pyridine Nucleotide Transhydrogenase. I. Indirect Evidence for the Reaction and Purification of the Enzyme. J.Biol.Chem. 195 (1952) 95.

14 DAHM,K., H.BREUER:
Anreicherung einer 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus der Nebenniere der Ratte. Hoppe-Seyler's Z. f. phys. Chem. 336 (1964) 63.

15 DAVENPORT,G.R., and L.E. MALLETTE:
Some Biochemical Properties of Rabbit Ovarian Hydroxysteroid Dehydrogenases. Endocrin.78(1966)672.

16 DAVIES,J., G.R. DAVENPORT, J.L. NORRIS, and P.I.C. RENNIC:
Histochemical Studies of Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Mammalian Reproductive Tissues. Endocrin. 78 (1966) 667.

17 DELIN,S., and J. PORATH: Purification of α- and ß-Hydroxysteroid Dehydrogenases from Pseudomonas Testosteroni by Gel Filtration.
Bioch. Biophys. Acta 67 (1963) 197.

18 DÖLLEFELD,E., H.BREUER: Nachweis von Östradiol: NAD^+- 17α- und 17ß-Oxidoreduktasen in der Cytoplasma-Fraktion der Pferde - Plazenta. Bioch. Biophys. Acta 124 (1966) 187.

19 DOUNCE,A.L.: In "Nucleic Acids" (E.Chergeffand, J.N. Davidson, eds.) Vol.II, S.93, Academic Press, New York (1955).

20 ENDAHL,G.L., C.D. KOCHAKIAN, and D. HAMM: Separation of a TPN-Specific Testosterone Dehydrogenase from DPN-Specific Dehydrogenase of Guinea Pig Liver. J. Biol. Chem. 235 (1960) 2792.

21 ENDAHL,G.L., and C.D. KOCHAKIAN: Partial Purification and Further Characterization of the TPN-Specific C_{19}-17ß-Hydroxysteroid Dehydrogenase of Guinea Pig Liver. Bioch. Biophys. Acta 62 (1962) 245.

22 FERRARI,R.A., and A. ARNOLD: Inhibition of ß-Hydroxysteroid Dehydrogenases. I. Structural Characteristics of some Steroidal Inhibitors. Bioch. Biophys. Acta 77 (1963) 349.

23 FERRARI,R.A., and A. ARNOLD: Inhibition of ß-Hydroxysteroid Dehydrogenases. II. Kinetics and pH Effect. Bioch. Biophys. Acta 77 (1963) 357.

24 FORCHIELLI,E., and R.J. DORFMAN: Separation of Δ 4-5α- and Δ 4-5ß-Hydrogenases from Rat Liver Homogenates. J. Biol. Chem. 223 (1956) 443.

25 GELOTTE,B.: Studies on Gel Filtration: Sorption Properties of the Bed Material Sephadex. J. Chromatogr. 3 (1960) 330.

26 GOLDBERG,B.,G.E.S.JONES, and D.A.TURNER: Steroid 3ß-ol Dehydrogenase Activity in Human Endocrine Tissues. Am. J. Obst. Gynec. 86(1963)349.

27 GOLDBERG,B., G.E.S.JONES, and H.I.BORKOWF: A Histochemical Study of Substrate Specificity for the Steroid 3ß-ol Dehydrogenase and Isomerase Systems in Human Ovary and Testis. J. Histoch. Cytochem. 12 (1964) 880.

28 GOLDMANN,A.S., A.M. BONGIOVANNI, W.C. YAKOVAC, and A.PRADER: Study of Δ 5,3ß-Hydroxysteroid Dehydrogenase in Normal Hyperplastic and Neoplastic Adrenal Cortical Tissues.J.clin. Endocr.Metab. 24 (1964) 894.

29 HAGERMANN,D.D., and C.VILLEE: Effect of Estradiole on the Metabolism of Human Endometrium in Vitro. J. Biol. Chem. 203 (1953) 425.

30 HOLLANDER,V.P., H. JONAS, and D.E.SMITH: Estradiol-Sensitive Isocitric Dehydrogenase in Noncancerous and Cancerous Human Breast Tissues. Cancer 11 (1958) 803.

31 HOLLANDER,V.P.,N.HOLLANDER, and J.D.BROWN: Inhibition of Steroid Mediated Pyridine Nucleotide Transhydrogenase and 17ß-Hydroxysteroid Dehydrogenase by 2-Adenylic Acid.Proc.Soc.Exptl.Biol.101 (1959) 475.

32 HÜBENER,H.J.,D.FUKUSHIMA, and T.F. CALLAGHER: Substrate Specificity of Enzymes Reducing the 11- and 20-Keto Groups of Steroids. J.Biol. Chem. 220 (1956) 499.

33 HÜBENER,H.J., F.G.SAHRHOLZ: 20ß-Hydroxysteroid-dehydrogenase. II. Darstellung und Kristallisation. Bioch. Z. 333 (1960) 95.

34 HURLOCK,B., P.TALALAY: Principles of the Enzymatic Measurement of Steroids.J.Biol.Chem.227 (1957) 37.

35 HURLOCK,B., P. TALALAY: 3α-Hydroxysteroids as Coenzymes of Hydrogen Transfer between Di- and Triphosphopyridine Nucleotides.J.Biol.Chem. 233 (1958) 886.

36 HURLOCK,B., P. TALALAY: Microsomal 3α- and 11ß-Hydroxysteroid Dehydrogenases. Arch.Bioch. 80 (1959) 468.

37 JARABAK,J., J.A.ADAMS,H.G.WILLIAMS-ASHMAN, and P. TALALAY: Purification of a 17ß- Hydroxysteroid Dehydrogenase of Human Placenta and Studies on its Transhydrogenase Function. J.Biol. Chem. 237 (1962) 345.

38 JENSEN,E.V.: Über die Wirkungsweise von Östrogenen. Dtsche.Med.Woschr. 88 (1963) 1229.

39 JÜTTING,G.: Die Östradiol-17ß-Dehydrogenase des Myometriums. Z. Gebh. Frauenh. 22(1962) 973.

40 JÜTTING, G.: Die Wirkung von Östrogenen auf die 17ß-Hydroxysteroid:NAD-oxydoreduktase des Myometriums von Kaninchen. Z.Gebh.Frauenh.26(1966)636.

41 KALCKAR,H.M.:Differential Spectrophotometry of Purine Compounds by means of Specific Enzymes. III. Studies of the Enzymes of Purine Metabolism. J.Biol.Chem. 167 (1947) 461.

42 KINSON,G.A., and C.D.KOCHAKIAN: DPN- and TPN-C_{19}-Steroid Dehydrogenases and Reductases in Accessory Sex Tissues. Am.J.Physiol. 206 (1964) 443.

43 KOCHAKIAN,C.D., B.R.CARROL, and B.UHRI: Comparisons of the Oxidation of C_{19}-Hydroxysteroids by Guinea Pig Liver Homogenates. J. Biol. Chem. 224 (1957) 811.

44 KOCHAKIAN,C.D., J.HILL, and S. AONUMA: Regulation of Protein Biosynthesis in Mouse Kidney by Androgens. Endocrinology 72 (1963) 354.

45 KOIDE,S., C.CHEN and S. FREEMAN: Inhibition of 3α-Hydroxysteroid Mediated Transhydrogenases of Rat Liver Homogenate by Δ4-3 oxo Steroids. Bioch. Biophys. Acta 38 (1960) 374.

46 KOIDE,S.: Purification of 3α-Hydroxysteroid Dehydrogenase,Obtained from the Soluble Fraction of Rat Liver. Arch.Bioch.Bioph.101(1963)278.

47 LANGER,L.J., and L.L.ENGEL: Human Placental Estradiol-17ß-Dehydrogenase.Fed.Proc.15(1956)296.

48 LANGER,L.J.,and L.L.ENGEL: Human Placental Estradiol-17ß-Dehydrogenase.J.Biol. Chem. 233 (1958) 583.

49 LEVY,H.R., and P.TALALAY:Bacterial Oxidation of Steroids. II. Studies on the Enzymatic Mechanism of Ring a Dehydrogenation. J. Biol. Chem. 234 (1959) 2014.

50 MARKUS,P.J.,and P.TALALAY: On the Molekular Specificity of Steroid Enzyme Combinations: The Kinetics of ß-Hydroxysteroid Dehydrogenases. Proc.Roy.Soc.London 144 (1955) 116.

51 MARKUS,P.J.,and P.TALALAY: Induction and Purification of δ- and ß-Hydroxysteroid Dehydrogenases. J. Biol. Chem. 218 (1956) 661.

52 MEYER,A.S.: Conversion of 19-Hydroxy Δ4-androstene-3,17-dione to Estrone by Endocrine Tissue. Bioch, Biophys. Acta 17 (1955) 441.

53 MITTERMAYER,C., H.BREUER,W.DIRSCHERL: Enzymatische Dehydrierung von Equilin zu Equilenin. Endocrin.43 (1963) 195.

54 MITTERMAYER,C., H.BREUER: Charakterisierung und Kinetik der Equilin-Dehydrogenase. Bioch. Biophys. Acta 77 (1963) 191.

55 MONDER,C., and A. WRIGHT: Proc. Intern Congr. Biochem. 5th, Moskau (1961), p.262.

56 NESEMANN,G.,H.J.HÜBENER,R.JUNK, J.SCHMIDT-THOME: 20ß-Hydroxysteroid Dehydrogenasen. I.Züchtung von Streptomyces hydrogenans und Induktion des Enzyms. Bioch. Z. 333 (1960) 88.

57 NESEMANN,G., H.J.HÜBENER,R. JUNK, J. SCHMIDT-THOME: 20ß-Hydroxysteroid Dehydrogenasen. II. Darstellung und Kristallisation. Bioch.Z.333 (1960) 95.

58 PORATH,J.,and P.FLODIN: Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation. Nature 183 (1959) 1657.

59 PORATH,J.: Some Recent Developments in Preparative Electrophoresis and Gel Filtration. Metabolism 13 (1964) 1004.

60 PORTIUS,H.J.,K.REPKE: Eine Östradiol-17ß Dehydrogenase in den Erythrozyten der Ratte. Arch. Exptl. Path. Pharm. 239 (1960) 144.

61 REPKE,K.:Die Kinetik der Umsetzung von Östron

und Östradiol-17ß durch Hefe. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm. 230 (1957) 178.

62 RUBIN, B.L., G.LEIPSNER, and H.W.DEANE: A Rapid Sensitive Assay Procedure for Adrenal Steroid-3ß-ol-Dehydrogenase Activity. Endocr. 69 (1961) 619.

63 SAMUELS, L.T., M.L.HELMREICH, M.B.LASATER, and M. REICH: An Enzyme in Endocrine Tissues which Oxidizes Δ5-3 Hydroxysteroids to α,ß Unsaturated Ketones. Science 113(1951)490.

64 SCHMIDT-THOME, J., G.NESEMANN, H.J. HÜBENER, J. ALESTER: 20ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. III. Substratspezifität der Oxydoreduktion und Induktion. Bioch.Z.336 (1962) 321.

65 SCHNEIDER, J.J.: Enzymatic Reduction of Compound E-21-Aldehyde to Compound E. J.Am.Chem.Soc. 75 (1953) 2024.

66 SQUIRE, P.G., S.DELIN, and J. PORATH: Physical and Chemical Characterization of Hydroxysteroid Dehydrogenases from Pseudomonas testosteroni. Bioch.Biophys.Acta 89 (1964) 409.

67 STEMPFEL, R.S., and J. SIDBURY: Studies with the Hydroxysteroid Dehydrogenases: I. A Simplified Method for the Enzymatic Estimation of 3- and 17-Hydroxysteroids. J.clin.Endocr. Metab. 24 (1964) 4.

68 TALALAY, P., M.M.DOBSON, and D.F.TAPLEY: Oxidative Degradation of Testosterone by Adaptive Enzymes. Nature (London) 170 (1952) 620.

69 TALALAY, P., and P.J.Markus: Enzymatic Formation of 3α-Hydroxysteroids. Nature(London) 173 (1954) 1189.

70 TALALAY, P., and P.J. MARKUS: Specificity, Kinetics, and Inhibition of α- and ß-Hydroxysteroid Dehydrogenases. J.Biol.Chem.218(1956) 675.

71 TALALAY, P.: Enzymatic Mechanismus in Steroid Metabolism. Physiol.Revue 37 (1957) 362.

72 TALALAY, P. and H.G. WILLIAMS-ASHMAN: Activation of Hydrogen Transfer between Pyridine Nucleotides by Steroid Hormones. Proc.Nat.Ac.Sci.44 (1958) 15.

73 TROOP, R.C.: Sex Difference in Metabolism of Cortisone by Rat Liver Homogenates. Fed.Proc. 17 (1958) 415.

74 TROOP, R.C.: Influence of Gonadal Hormones on the Methabolism of Cortisone. Endocr.64(1959)671.

75 UNGAR, F., and R.J. DORFMAN: The Conversion of 17α-21-Dihydroxypregnane-3,20-dione to 3α, 17α, 21-Trihydroxypregnanė-20-one in Vitro. J.Am.Chem.Soc. 76 (1954) 1197.

76 UNGAR, F., M. GUT, and R.J. DORFMAN: Metabolism of Δ4-Androstene-3α, 17ß-diol in Vitro. J. Biol. Chem. 224 (1957) 191.

77 VILLEE, C., and D.D. HAGERMAN: On the Identity of the Estrogen-Sensitive Enzyme of Human Placenta. J.Biol.Chem.233 (1958) 42.

78 VILLEE, C., D.D. HAGERMAN, P.B. JOEL: An Enzymatic Basis for the Physiologic Functions of Estrogens. Recent Progr.Horm.Res. 16 (1960) 49.

79 VILLEE, C., J.M. SPENCER: Some Properties of the Pyridine Nucleotide-Specific 17ß-Hydroxysteroid Dehydrogenases of Guinea Pig Liver. J.Biol.Chem. 235 (1960) 3615.

80 VILLEE,C., and L. ENGEL: Mechanism of Action of Steroid Hormones, (1961) Pergamon Press, New York.

81 VILLEE,C.: Die Beeinflussung von Enzymen im Uterus und Plazenta durch Östrogene. Klin.Wschr. 39 (1961) 173.

LEBENSLAUF

Am 19.8.1942 wurde ich, Klaus-Jürgen Otto Thun, als einziges Kind des Gymnasialprofessors Fritz Thun und seiner Ehefrau Dorothea, geb. Hoffmann, in Goldberg/ Schlesien geboren.

Nach der Vertreibung 1945 erreichten wir den oberfränkischen Raum, wo ich erst in Haig (Landkreis Kronach), später in Coburg die Volksschule besuchte. Im Jahre 1952 trat ich in das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium "Ernestinum" ein und legte 1961 das Abitur ab.

Das Studium der Medizin begann ich an der Universität Erlangen, an der ich im Jahre 1962 die naturwissenschaftliche, 1964 die ärztliche Vorprüfung bestand. Das 6. und 7. Semester studierte ich in Freiburg. Im Dezember 1964 heiratete ich und zog mit meiner Frau Bärbel, geb. Dietze, nach München. Dort schloß ich das Medizinstudium im Sommer 1967 durch das Staatsexamen ab.